UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

391

O. VERONA, G. PICCI, P. GAMBOGI

INFLUENZA ESERCITATA SUI MICRORGANISMI DALLE SOSTANZE CHE I SEMI GERMINANTI RIVERSANO NEL MEZZO DURANTE LA FASE DI IMBIBIZIONE

Estratto da « *L'Agricoltura Italiana* » Anno LIX (XIV N. S.) - Febbraio 1959

TIPOGRAFIA EDITRICE COMM. UMBERTO GIARDINI - PISA

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
18 MAR 1966

UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

391

O. VERONA, G. PICCI, P. GAMBOGI

INFLUENZA ESERCITATA SUI MICRORGANISMI DALLE SOSTANZE CHE I SEMI GERMINANTI RIVERSANO NEL MEZZO DURANTE LA FASE DI IMBIBIZIONE

Estratto da « *L'Agricoltura Italiana* » Anno LIX (XIV N. S.) - Febbraio 1959

TIPOGRAFIA EDITRICE COMM. UMBERTO GIARDINI - PISA

RIASSUNTO — Per una migliore conoscenza dell'« effetto-seme » nel terreno (spermosfera) sono state eseguite alcune ricerche intese ad osservare l'influenza esercitata dalle sostanze che il seme germinante lascia nel mezzo idrico durante la fase di imbibizione, sullo sviluppo dei microrganismi.

Con riferimento ai semi sperimentati tale influenza si è manifestata favorevole sullo sviluppo microbico.

SUMMARY — To contribute to a wider knowledge upon the « seed-effect » in the soil (« spermosphere »), some researches were carried in order to observe the influence exercised on the growth of microrganisms by the substances leaved by seeds in the water in which they were imbibiting.

Concerning to the experimented seeds, such an influence was positive on microbial growth.

Uno di noi ha dato il nome di « spermosfera » all'ambiente biologico che, nel terreno, circonda il seme in via di germinazione (v. O. Verona, *Ann. Inst. Pasteur, 95*, 795, 1958).

Evidentemente, nel dominio della spermosfera, si stabiliscono eventi microbici che si pensano legati, almeno in parte, alle attività metaboliche del seme germinante.

Qualsiasi siano le fasi che accompagnano la germinazione la prima è pur sempre quella che caratterizza il processo di imbibizione e conseguente rigonfiamento del seme. Quì non ha importanza rilevare nè la rapidità o meno con la quale avviene tale assorbimento, nè la quantità d'acqua assorbita, l'una e l'altra dipendenti, d'altronde, dalla natura e dimensioni dei semi, come dalle condizioni fisiche, chimiche ed anatomiche dei tegumenti avvolgenti gli stessi semi.

E' però da rilevarsi come, durante la fase di imbibizione, i semi cedano all'ambiente idrico che li circonda alcune sostanze: se non altro quelle che si rendono più facilmente solubili o dispersibili e che avvolgono la parte esterna dei tegumenti.

Ora, fino a qual punto e in quale maniera tali sostanze influiscono sopra la microflora del terreno?

E' quanto ci siamo proposti di vedere — almeno in prima approssimazione — attraverso le esperienze che qui si riferiscono.

* * *

Eperienza n. 1.

gr. 15 di cariossidi di frumento e gr. 15 di semi di erba medica, di lino e di senape, previo accurato lavaggio sono stati tenuti in contatto, per 24 ore a temperatura di 5-6°C., con cc. 100 di acqua di fonte. Dopo 24 ore i liquidi furono separati dai semi. Tali liquidi e, per controllo, sola acqua, furono quindi agarizzati all'1.5% e sterilizzati.

Con tali mezzi nutritivi si allestirono allora piastre inficiate ciascuna di cc. 0.1 di una sospensione di terra in acqua nel rapporto 1:1.000. Usammo 10 piastre per prova. Di queste ne furono contate sei in quanto le altre si presentavano incontabili per presenza di specie invadenti.

Dopo sei giorni di incubazione in termostato a 25°C. il conteggio delle colonie sviluppatesi dette il seguente risultato:

TAB. I — N° DI COLONIE IN PIASTRE INOCULATE CON cc. O. 1 DI UNA SOSPENSIONE 1:1.000 DI TERRA IN ACQUA.

agar-acqua	agar preparato con i liquidi di contatto di			
	frumento	erba medica	lino	senape
42	158	131	145	171
58	119	150	158	182
46	134	146	153	175
51	123	128	141	156
54	140	162	155	178
56	158	142	160	162
51±2.28	138.6±6.2	143.2±4.6	176.6±4	170.6±3.2

Apparì dunque evidente come gli agar allestiti con i liquidi nei quali furono in contatto i semi consentissero uno sviluppo ben mag-

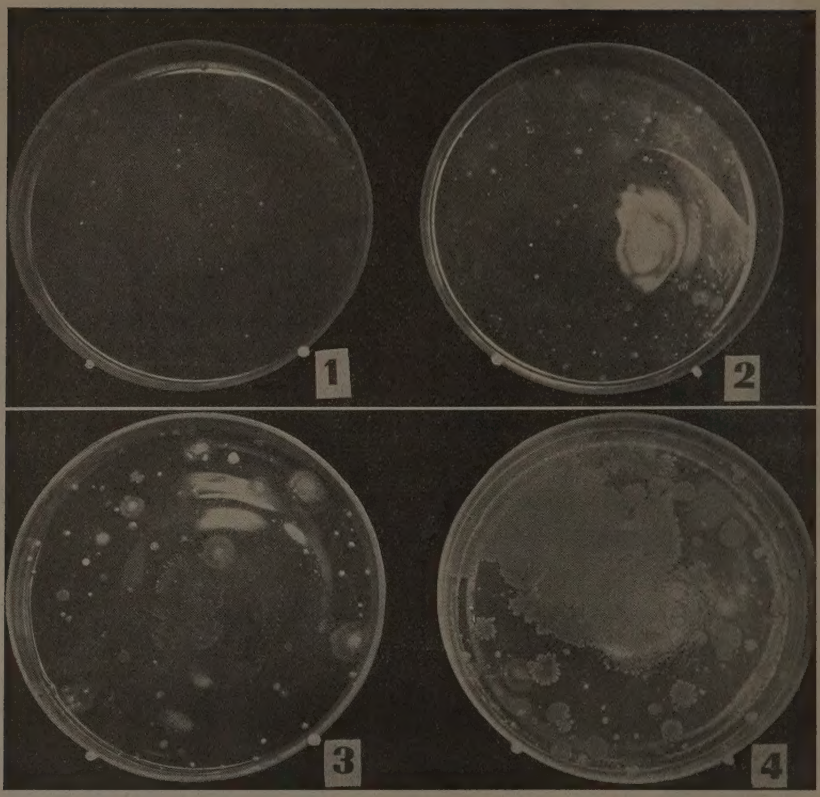

Fig. 1 - Piastre inficiate con cc. 0.1 di uno stemperamento di gr. 1 terra in cc. 1.000 acqua e allestite con: 1, agar-acqua; 2, agar liquido seme-frumento; 3, agar liquido seme-erbamedica; 4, agar liquido seme-senape.

giore di colonie rispetto al numero di colonie sviluppatesi nel semplice agar-acqua.

Al momento non ha molto interesse rilevare il comportamento non identico dei liquidi provenienti dal contatto con i vari semi appena notando come, il maggior sviluppo, si sia avuto nei liquidi provenienti da senape e da lino.

Piuttosto è da rilevarsi come, indipendentemente dal numero, ne-

gli agar formati con il liquido-seme le colonie si siano spesso sviluppate di dimensioni notevolmente maggiori che in agar-acqua.

Esperienza n. 1 *bis.*

Era evidente chiedersi a tal punto se il riscontrato maggior numero di colonie fosse dovuto ad una maggiore ricchezza nutritiva dei liquidi. Insomma dovevamo vedere cosa, almeno quantitativamente, i semi cedevano all'acqua a seguito del contatto prolungatosi per 24 ore. Pertanto, gli stessi liquidi, una volta raccolti furono portati a secco ottenendosi:

TAB. II — QUANTITA' DI S.S. IN ACQUA NELLA QUALE FURONO TENUTI IMMERSI PER 24 ORE ALLA TEMPERATURA DI 5-6°C. SEMI DIVERSI RAPPORTO SEMI/ACQUA = 15/100.

	liquido raccolto cc.	pH del liquido raccolto	sostanza secca		
			mg. nel liquido raccolto	mg. per cc. 100 di liquido	mg. per grammo di seme
frumento . . .	95	6.4	46.55	49	3.1
erba medica .	80	6.5	261.60	327	19.4
lino	70	6.3	415.80	594	27.7
senape	75	6.2	317.25	423	21.1

Evidentemente i liquidi in parola contengono una certa somma di sostanze. Ma, qualsiasi sia la natura e costituzione di tali sostanze non ci sembra, data la loro quantità (molto esigua nel frumento, ad es.) che esse siano tali da influire sullo sviluppo microbico, nel modo che abbiamo visto influire, come puramente apportatrici, cioè, di materiale trofico ed energetico.

Esperienza n. 2.

Come l'esperienza n. 1. Solo che fu impiegato, per la prova colturale, agar nutritivo preparato sostituendo all'acqua i liquidi provenienti dal contatto con i semi.

Le colonie svoluppate in piastra dettero al conteggio le cifre che seguono:

TAB. III — N° DI COLONIE IN PIASTRE INOCULATE CON cc. O. 1 DI UNA SOSPENSIONE 1:1.000 DI TERRA IN ACQUA.

agar-nutritivo	agar-nutritivo preparato con liquidi provenienti dal contatto con semi di			
	frumento	erba medica	lino	senape
210	220	207	233	229
187	212	240	214	250
203	245	221	239	254
226	227	236	239	248
199	238	224	222	258
191	226	237	241	232
203±5.2	228±4.4	227±4.8	231±8.9	245±7.5

I risultati di questa esperienza ripetono, fondamentalmente, quelli della prima anche se, rispetto al controllo, le differenze appaiono meno sensibili. In più è stato ancora notato il maggior sviluppo dimensionale delle colonie negli agar allestiti con i liquidi-semi. Anche per questa esperienza sembrano valide — nella interpretazione dei risultati — le considerazioni fatte attraverso l'esperienza n. 1 bis. In altri termini il maggiore sviluppo registrato non ci sembra spiegabile con l'apporto trofico offerto, al mezzo già ricco, dalle pochissime sostanze contenute nei liquidi di contatto dei semi.

Esperienza n. 3.

Uno strato di terreno alto circa cm. 1 è stato disposto in piccole scatole di vetro. Una serie di tre scatole fu lasciata tal quale; altra serie, sempre di tre scatole, fu seminata *massivamente* con semi di tabacco. Le scatole furono tutte ugualmente inumidite e poste in termostato per quattro giorni: tempo generalmente richiesto ai semi di tabacco per entrare in germinazione.

Al quarto giorno, nel terreno contenuto nelle due serie di scatole fu determinato con il metodo delle sospensioni-diluizioni il numero dei microrganismi presenti. Trovammo:

	N° di microrganismi per grammo di terra secca
Terreno non seminato	1.250.000
Terreno contenente semi	3.300.000

Nel terreno, dunque, ove si trovavano da quattro giorni semi di tabacco in corso di germinazione si è notato un numero di microrganismi superiore a quello presente nel controllo.

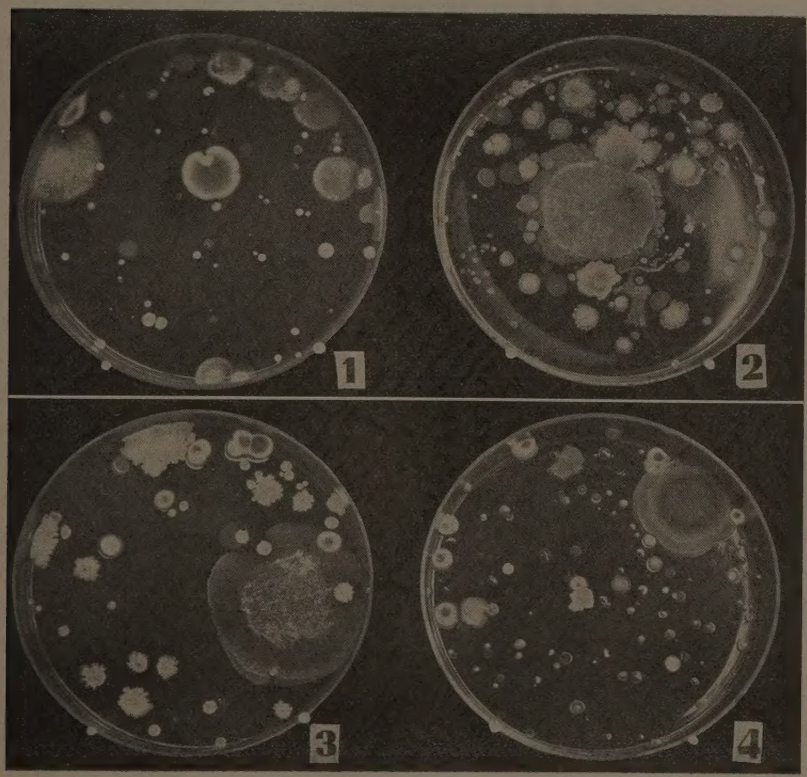

Fig. 2 - Piastre inficiate con cc. 0.1 di uno stemeramento di gr. 1 terra in cc. 1.000 acqua e allestite con: 1, agar-nutritivo; 2-3-4, con agar-nutritivo rispettivamente preparato con liquido-seme di frumento (2), lino (3), senape (4).

Esperienza n. 4.

In continuazione abbiamo voluto vedere l'influenza esercitata dai liquidi di contatto con i semi (limitatamente a frumento e a senape) sullo sviluppo singolo di alcuni funghi.

Gli stessi liquidi furono quindi agarizzati avendo a controllo da una parte agar-acqua e dall'altra agar-fagioli saccarosato. I funghi scelti a test furono: *Absidia robusta, Fusarium solani, Alternaria tenuis, Cladosporium elatum.*

Seminati al centro di una piastra e incubati a 26°C. il loro sviluppo fu seguito ed apprezzato mediante la misura periodica del diametro delle colonie e mediante osservazione dei caratteri macro- e microscopici della vegetazione.

In *Absidia robusta* non si ebbe quasi nessun sviluppo in agar-acqua e ottimo in agar-fagioli saccarosato. Negli agar liquido-senape e liquido-frumento lo sviluppo dimensionale delle colonie fu apprezzabile se pure al disotto di quello presentato dalle colonie cresciute in agar-fagioli. Se lo sviluppo dimensionale fu apprezzabile la consistenza delle coloni eapparì tuttavia — negli agar liquido-semi — debole e lassa. Scarsa anche la fruttificazione.

In *Fusarium solani* un qualche sviluppo si ebbe anche nel semplice agar-acqua. Non differenze notevoli nelle dimensioni delle colonie cresciute negli altri mezzi; ma, come nel caso precedente, differenze notevoli nella consistenza. Inoltre: fruttificazione abbondante e scarsissima presenza di clamidospore in agar-fagiuoli saccarosato; fruttificazione più scarsa e maggiore presenza di clamidospore negli altri substrati; solo clamidospore in agar-acqua.

Analogo quadro in *Alternaria tenuis;* quivi, peraltro, non differenze notevoli nella fruttificazione.

Cladosporium elatum ha dato, in ogni caso, colonie non grandi e non tali da far rilevare differenze sensibili nei vari substrati.

I liquidi provenienti dal contatto con i semi di frumento e di senape agarizzati consentono dunque ai funghi saggiati un qualche sviluppo che altrimenti rimane scarso o appare assente in agar-acqua. I caratteri

macroscopici delle colonie e i caratteri microscopici della vegetazione indicano tuttavia che gli stessi funghi, pur sviluppando, assumono un abito si sofferenza, abito dovuto, presuntivamente, a condizioni carenziali del mezzo.

Esperienza n. 5.

Un'ultima esperienza fu allestita allo scopo di avere idea se, nei liquidi ricordati, si contenessero fattori vitaminici. Ai fini di un saggio preliminare pensammo sufficiente prendere a test un ceppo di *Kloeckera*

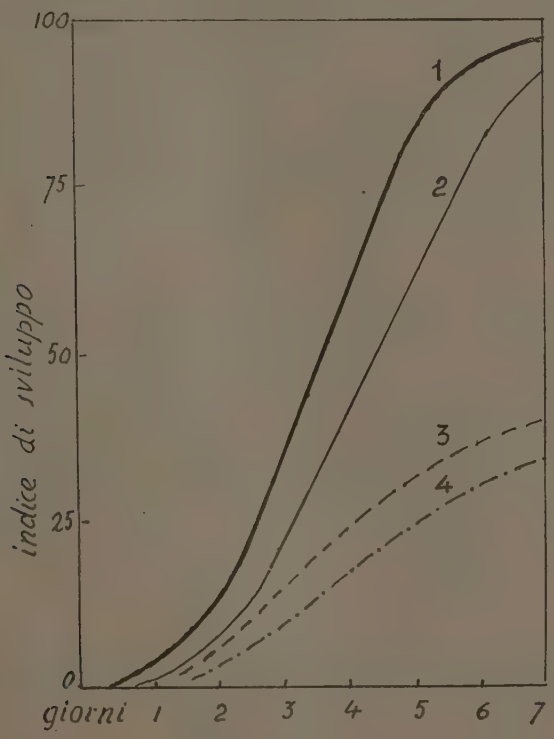

Fig. 3 - Sviluppo di *Kloeckera apiculata* in liquido di Williams con vitamine (1) e nello stesso liquido senza vitamine con aggiunta in: (2), cc. 5 di liquido-seme di senape; (3-4), cc. 10 e 5 rispettivamente di liquido-seme di frumento. (Nel liquido di Williams senza vitamine nessuno sviluppo).

apiculata, specie generalmente incapace di svilupparsi in assenza di alcune vitamine (es. inosite, piridossina, Ca-pantotenato). L'esperienza fu eseguita prendendo a base il liquido di Williams:

A) privo di vitamine
B) contenente vitamine
C-D) contenente, al posto delle vitamine, cc. 5 (C) o cc. 10 (D) per 100 di liquido-seme limitatamente a frumento e senape (*)

Dopo sterilizzazione e semina le varie colture furono incubate a 25°C. seguendone lo sviluppo, giornalmente, mediante apprezzamento nefelometrico. I risultati sono riportati in figura. Essi informano che nei liquidi-seme di frumento e di senape sono contenute sostanze da presumersi di natura vitaminica in quanto capaci di consentire lo sviluppo di un ceppo auxo-eterotrofo di *Kloeckera apiculata* quando questo sia coltivato in mezzo vitaminico-carente.

CONCLUSIONI

Le riferite esperienze portano alle seguenti conclusioni:

1) Cariossidi di frumento e semi di medica, lino e senape lasciati in contatto per 24 ore con acqua — cioè durante il periodo di imbibizione — cedono alla stessa una certa somma di sostanze.

La quantità di tali sostanze varia, ovviamente, in rapporto alla natura del seme e in rapporto al tempo di contatto che il seme ha con l'acqua pur mantenendosi, comunque, entro valori modesti.

(*) Le quantità di sostanze contenute nei cc. 5 e cc. 10 di liquido-seme aggiunto a cc. 100 di l. di Williams, corrispondono alle seguenti:

frumento: cc. 5 = mg 2.45; cc. 10 = mg 4.90
senape: cc. 5 = mg 21.15; cc. 10 = mg 42.30

La prova riferita aveva solo, come si è detto, scopo orientativo. Essa sarà ripresa ed estesa e allora, le aggiunte di liquido-seme al mezzo vitaminico-carente saranno effettuate no in base al volume del liquido, ma in base al suo contenuto in sostanza secca.

2) Nonostante si tratti di modestissime quantità i liquidi che contengono tali sostanze consentono un sufficiente sviluppo microbico oppure sono capaci di incrementarlo qualora gli stessi liquidi siano utilizzati nella preparazione di normali mezzi nutritivi.

3) Lo sviluppo che si registra può, in alcuni casi, pensarsi legato all'apporto trofico di tali sostanze; e, come tale apporto, non è considerevole, lo sviluppo può apparire stentato e deficiente.

4) E' pensabile peraltro che i semi lascino passare nei liquidi con i quali si trovano in contatto sostanze di natura vitaminica, poichè la presenza di piccole quantità di tali liquidi si è dimostrata determinante allo sviluppo di germi auxo-eterotrofi.

5) Tali conclusioni debbono, naturalmente, ritenersi valide entro i limiti delle esperienze eseguite e per i semi sperimentati. Poichè non è escluso che, semi diversi, lascino nel mezzo idrico nel quale si trovano, sostanze ad azione diversa, fors'anche negativamente influente sullo sviluppo microbico.

Comunque sia l'ambiente microbico da noi definito come « spermosfera » risente della prima attività del seme germinante (imbibizione) come qui si è lasciato intravedere.

O. Verona, G. Picci, P. Gambogi

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Pisa